

УДК 541.69:541.572:615.781.6

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭЛЕКТРОННЫХ И СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ФРАГМЕНТОВ ИНГИБИТОРОВ ДИГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ**© 2009 Е.С. Афонькина<sup>1</sup>, Е.С. Переяславская<sup>1</sup>, В.А. Потемкин<sup>1\*</sup>, М.А. Гришина<sup>1</sup>, Г.Л. Русинов<sup>2</sup>, О.В. Федорова<sup>2</sup><sup>1</sup>Челябинский государственный университет<sup>2</sup>Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург

Статья поступила 21 июня 2008 г.

Проведен анализ влияния структурных характеристик ингибиторов дигидрофолатредуктазы на величину их туберкулостатической активности. Показано, что увеличение электронной плотности на связях и атомах в кольце приводит к повышению биологической активности соединений. Обнаружена корреляция биологической активности с характеристиками критических точек электронной плотности связей. В результате исследований в рамках 3D- и 4D-QSAR алгоритма CiS установлены фармакофорные и антифармакофорные фрагменты ингибиторов DHFR, найдены области рецептора, определяющие процесс биологического действия производных дигидропиримидина. Проведено моделирование комплексов рецептор—лиганд. При рассмотрении ряда лекарственных средств, содержащих подандную цепь, обнаружено, что подандная цепь выполняет исключительно транспортную мембранотропную функцию, поскольку увеличение размера молекул за счет подандной цепи приводит к возникновению стерических затруднений при ее встраивании в полость рецептора.

**Ключевые слова:** 3D- и 4D-QSAR, биологическая активность, дигидрофолатредуктаза, ингибитор, фармакофор, мультиконформационный анализ.

**ВВЕДЕНИЕ**

С момента возникновения направления QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) [1—4] создано и развито значительное количество методов исследования взаимосвязей биологической активности с различными структурными характеристиками соединений [5—8]. Успехи в данной области дали возможность провести описание и анализ механизмов и причин биологического действия широкого круга соединений различных терапевтических категорий [8, 9]. Развитие современных методов прецизионного рентгеноструктурного анализа, а также квантово-химических методов позволяет детально проанализировать распределение электронной плотности в соединениях и выявить электронно-трансферабельные и электронно-вариабельные части молекул лекарственных средств, что в свою очередь позволяет на новом уровне определить фармакофорные фрагменты соединений и выявить электронные факторы их биологического действия.

Производные пиримидина обладают высоким фармакологическим потенциалом, они проявляют противотуберкулезную активность, являются модуляторами кальциевых каналов, антагонистами адренорецепторов, а также противоопухолевыми и противогипертоническими агентами [10—12]. В настоящей работе как лекарственные средства рассматриваются мембранотропные туберкулостатические соединения класса ингибиторов дигидрофолатредуктазы (DHFR).

\* E-mail: pva@csu.ru

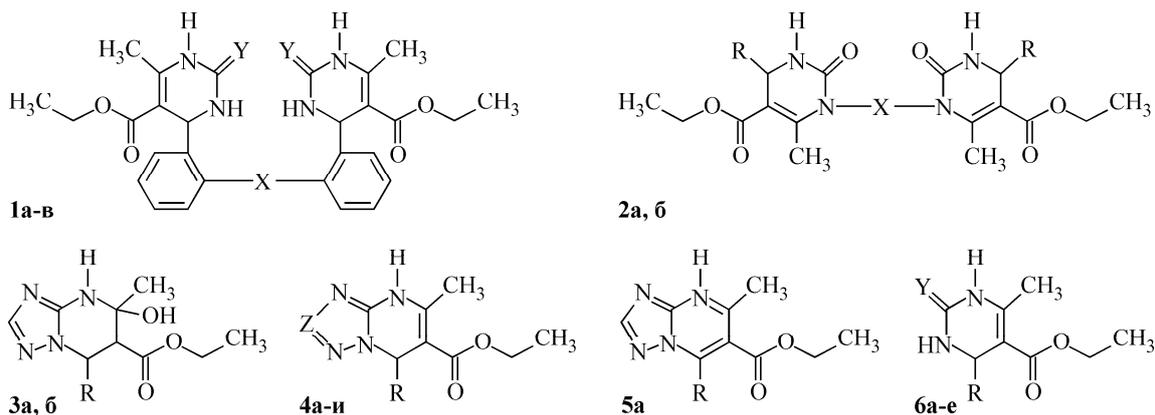


Рис. 1. Структурные формулы рассматриваемых соединений.

**1:** **а** (RR) X=—OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O—, Y=O, **б** (RS) X=—(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>—O—, Y=S; **в** (RS) X=—(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>—O—, Y=O  
**2:** **а** (RS) X=—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—, R=Ph, **б** (RR) X=—CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>—, R=Ph **3:** **а** (SSS) R = Ph, **б** (SRS) R=2,6-OMe-4-OH—Ph **4:** **а** Z=CH, R=2-тиофенил, **б** Z=CH, R=4-Pr, **в** Z=CH, R=2-NO<sub>2</sub>—Ph, **г** Z=CH, R=H, **д** Z=CH, R=Ph, **е** Z=CH, R=2,6-OMe-4-OH—Ph, **ж** Z=N, R=Ph, **з** Z=N, R=4-Pr, **и** Z=CH, R=4-SEt—Ph **5:** **а** R=Ph **б:** **а** Y=O, R=2-тиофенил, **б** Y=O, R=Ph, **в** Y=O, R=4-NO<sub>2</sub>—Ph, **г** Y=O, R=—CH<sub>2</sub>CH=CH—Ph, **д** Y=O, R=2-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>—Ph, **е** Y=S, R=Ph

Рассмотренный ряд производных дигидропиримидинов, состоящий из 23 молекул, представлен на рис. 1.

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФАРМАКОФОРНЫХ И АНТИФАРМАКОФОРНЫХ ФРАГМЕНТОВ ИНГИБИТОРОВ DNFR

Для определения фармакофорных и антифармакофорных частей молекул было проведено моделирование алгоритмом CiS (Cinderella's Shoe) [ 13 ] их ориентацией в модельном рецепторе, который представляет собой комплементарное поле в виде совокупности псевдоатомов (пробных сфер с некоторым зарядом и радиусом), контактирующих с поверхностью молекулы. Характеристики комплементарного поля определяются кулоновскими и ван-дер-ваальсовыми потенциалами псевдоатомов [ 9, 13 ]. Так, фармакофорными частями (соответствующие атомы выделены темно-серым цветом) являются дигидропиримидиновая часть, соединенная с триазольным или тетразольным фрагментом, оксиацильный радикал, а также часть ароматического заместителя, соединенная с гетероциклическим фрагментом через атом углерода C4 (рис. 2). Данные фрагменты обеспечивают эффективное связывание с модельным рецептором. Периферические части соединений, напротив, понижают величину биологической активности (соответствующие атомы выделены светло-серым цветом).

При рассмотрении соединений, содержащих подандные цепи (рис. 3), обнаружено, что подандные фрагменты молекул проявляют антифармакофорное действие, которое связано с большими размерами подандной цепи, а также расположением данной части молекулы в модельном рецепторе. Увеличение размера молекул за счет подандной цепи может приводить к возникновению значительных стерических затруднений при ее встраивании в полость рецептора. Согласно данным расчета с помощью алгоритма CiS, поданды проявляют низкую туберкулоостатическую активность, которая не превышает 0,97. В то время как действительная величина активности для этих соединений *pMIC* (*MIC* — минимальная ингибирующая концентрация в отношении штамма *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, определенная в моль/мл по методике, приведенной в [ 14 ]) варьируется в интервале 3—5. Таким образом, можно предположить, что после проникновения соединения, содержащего подандную цепь, происходит разрыв связи в этой цепи с образованием небольших фрагментов, которые имеют большую активность, чем исходная молекула. Фармакофорным фрагментом является тригидропиримидиновый фрагмент, так же как у соединений, не содержащих подандных цепей. Балластная часть соединения, обозначенная на рис. 3 сплошной тонкой линией, не оказывает ни фармакофорного, ни антифармако-



Рис. 2. Фармакофорные и антифармакофорные части молекулы

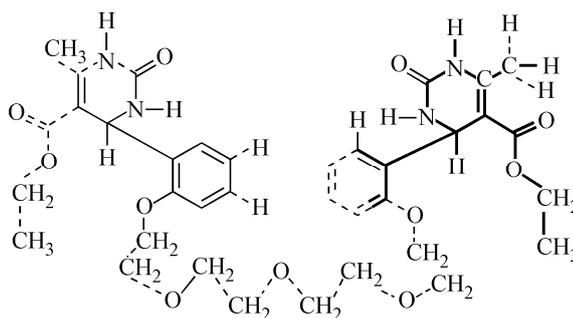


Рис. 3. Фармакофорные (жирная линия), антифармакофорные (пунктирная линия) и балластные (тонкая сплошная линия) части молекулы, содержащей подандную цепь

форного влияния в связывании с рецептором, но она обеспечивает матричную функцию и необходимую ориентацию молекулы в полости рецептора.

Согласно терапевтической практике, активными считали соединения с величиной  $pMIC > 4,5$ , а неактивными — с  $pMIC \leq 4,5$ . При сравнении активных молекул (наложении их друг на друга) наблюдается хорошее совпадение фармакофорных и антифармакофорных фрагментов, что подтверждает предположение о сходной ориентации частей активных молекул в модельном рецепторе (рис. 4 и 5). Для неактивных соединений такого совпадения при наложении молекул не наблюдается.

#### ПОСТРОЕНИЕ МОДЕЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЛИГАНД—РЕЦЕПТОР

В связи с тем, что число атомов реального рецептора достаточно велико, и возникают сложности в определении его активных центров связывания с лигандом, было осуществлено построение комплексов лиганд—модельный рецептор. Моделирование комплексов проводили с использованием алгоритма CiS, который позволил определить ориентацию рассматриваемых молекул в ферменте. Ориентацию молекул в модельном рецепторе уточняли в ходе оптимизации геометрии с использованием силового поля ММ3 [15—17]. Обнаружено, что связывание фармакофорных частей лекарственного средства с модельным рецептором осуществляется за счет кулоновских взаимодействий с положительно заряженной областью рецептора (область II на рис. 6), а также взаимодействий липофильных частей молекул с липофильными областями рецептора. Большинство активных соединений имеют ароматический цикл, соединенный с атомом С4 в дигидропиримидине. В конформерах, проявляющих высокую активность, ароматическое кольцо расположено перпендикулярно относительно дигидропиримидиновой части. Часть ароматического цикла, соединенная с дигидропиримидином, являясь фармакофором, взаимодействует с положительной частью рецептора (область II). Оксиацильный радикал располагается в липофильной части (область III), способствуя образованию ван-дер-ваальсовых контактов, и в отрицательно заряженной области рецептора (область I), с которой осуществляются электростатические взаимодействия (см. рис. 5). Для неаннелированных молекул **6a—6e** не найдено сильного взаимодействия оксидигидропиримидинового радикала с положительно заряженной областью модельного рецептора (оксидигидропиримидиновый фрагмент располагается параллельно к этой части рецептора). Для соединений **3b**, **4e**, и **4и** снижение активности про-

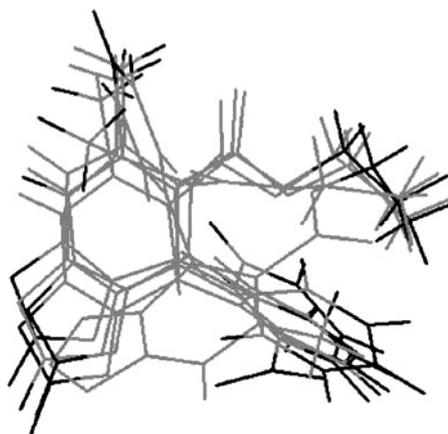


Рис. 4. Наложение активных молекул в модельном рецепторе

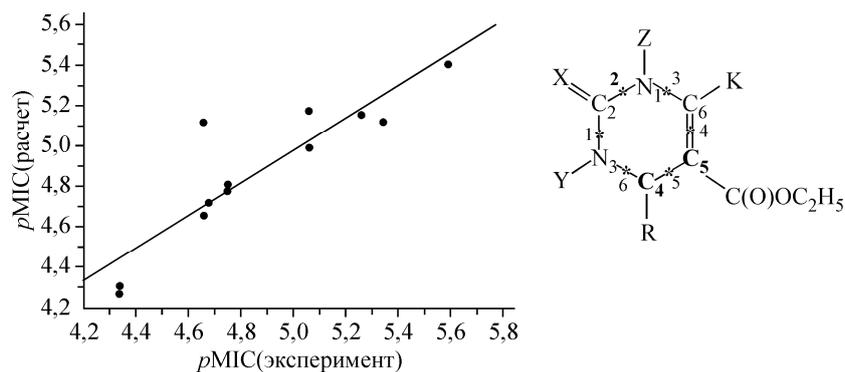


Рис. 5. Экспериментальные и рассчитанные по уравнению (1) величины  $pMIC$

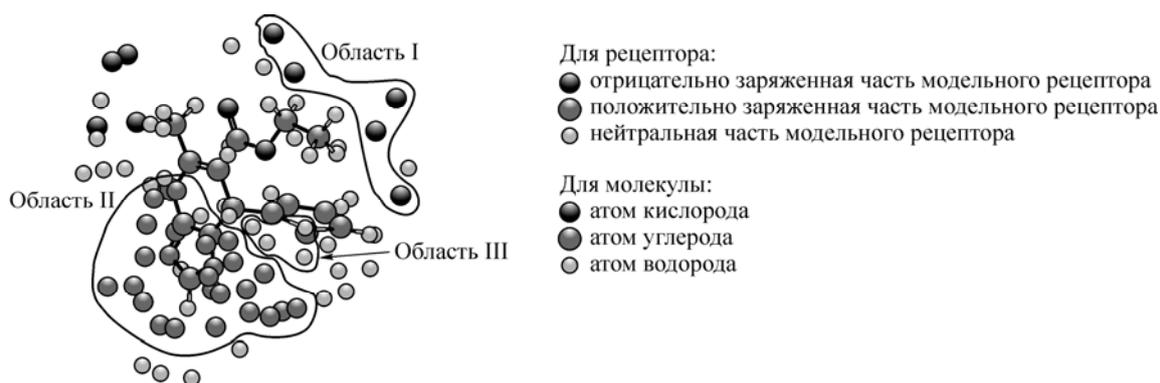


Рис. 6. Комплекс модельного рецептора с лекарственным средством

исходит за счет объемных заместителей в бензольном кольце, которые затрудняют связывание молекулы с рецептором.

### КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для подтверждения изложенных выше результатов были проведены квантово-химические расчеты электронных и энергетических характеристик. В данном исследовании особое внимание было уделено общему для исследуемых соединений фрагменту — дигидропиримидиновому циклу. Был проведен мультikonформационный анализ с использованием алгоритма MultiGen [18, 19]. Для анализа связи биологической активности со структурными параметрами дигидропиримидинов были проведены квантово-химические расчеты электронных и энергетических характеристик атомов дигидропиримидинового кольца (DFT B3LYP/6-311G( $d,p$ )) [20]. В рамках теории AIM (Atoms In Molecules) [21] выполнен квантово-топологический анализ электронной плотности, вычислены электронные характеристики в критических точках электронной плотности. Кроме того, проведено интегрирование электронных и энергетических характеристик по атомным бассейнам дигидропиримидинового кольца.

Установлено, что биологическая активность соединений связана с интегральными характеристиками зарядов атомных бассейнов гетероцикла, в частности, с зарядами атомных бассейнов атомов C4 и C5. Величина  $pMIC$  может быть описана уравнением:

$$pMIC = 7 - 15V_2 + 11(Q_5 + Q_4), \quad (1)$$

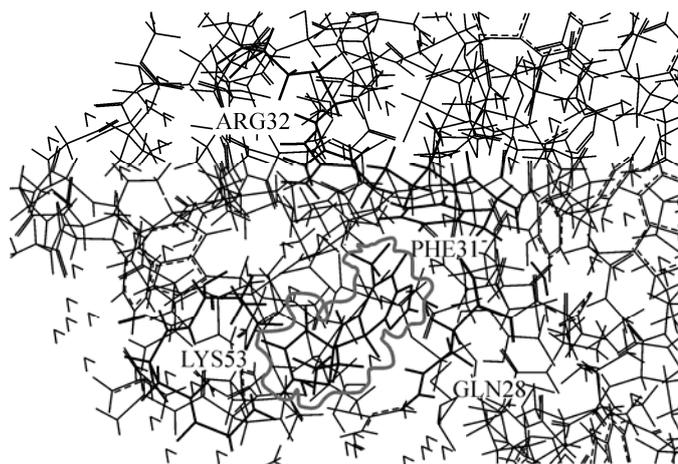
где  $V_2$  — плотность потенциальной энергии в критической точке (3;-1), отвечающей связи N1—C2 дигидропиримидинового цикла (см. рис. 5), ат.ед.;  $Q_5$  — заряд бассейна C5, ат.ед.;  $Q_4$  — заряд бассейна C4, ат.ед. Коэффициент корреляции  $R = 0,90$ , критерий Фишера  $F = 11$ , стандартное отклонение  $S = 1,3$ .

Атомы углерода C4 и C5 в дигидропиримидиновом цикле имеют отрицательный заряд атомного бассейна от 0 до  $-0,026$  ат.ед., при этом наблюдается достаточно сильное разделение зарядов на атомах двойной связи C5=C6. Биологическая активность возрастает с увеличением

Рис. 7. Размещение производного триазоло-дигидропиримидина в полости DHFR

Результаты сопоставления структур рассчитанных комплексов с данными рентгеноструктурного анализа

Структура	Стандартное отклонение, Å	Максимальное отклонение, Å
1df7	1,2	2,1
1dg5	0,3	0,7
1dg7	0	0



зарядов атомных бассейнов и зависит от связывания этих атомов с рецептором. Таким образом, квантово-химические расчеты подтверждают результаты моделирования, согласно которым один из возможных механизмов противотуберкулезного действия производных пиримидина заключается в их связывании с (DHFR) [ 22 ], описанном в следующем разделе.

#### МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО—ФЕРМЕНТ

В настоящей работе было проведено сопоставление результатов моделирования комплексов с модельным и с реальным DHFR рецептором. Использование данных рентгеноструктурного анализа комплекса DHFR с известным лекарственным препаратом (метотрексат, триметоприм, 4-bromo-WR99210 [ 23 ]) и данных об ориентации молекул, полученных в рамках алгоритма CiS, позволило определить ориентацию рассматриваемых соединений в ферменте. Достоверность ориентации молекул в полости белка проверена при сопоставлении структур расчетных комплексов со структурами комплексов, для которых в Protein Data Bank найдены данные рентгеноструктурного анализа [ 24—26 ]. Результаты сопоставления для соединений 1df7, 1dg5, 1dg7 (идентификаторы в Protein Data Bank) приведены в таблице. Расчет стандартных отклонений проводили по всем атомам молекул. Видно, что расчетная ориентация хорошо согласуется с экспериментально установленной.

Обнаруженные активные центры модельного рецептора хорошо воспроизводят активные центры реального рецептора — атомы и фрагменты сайта. Анализ пространственного строения полученных комплексов дигидропиримидинов с белком показал, что молекулы, проявляющие высокую биологическую активность, располагаются в полости рецептора DHFR (она представлена ARG23, PRO25, GLN28, PHE31, ARG32, MET36, SER49, PRO51, LYS53, VAL54, ARG60) таким образом, что к донной части полости ориентирована эфирная группа, а гетероциклические фрагменты взаимодействуют с аминокислотными остатками на входе в полость рецептора (рис. 7). Таким образом, дигидропиримидины оказываются связанными посредством межмолекулярных взаимодействий с аминокислотными остатками GLN28, PHE31, ARG32, SER49, VAL54, ARG60, причем контакт осуществляется посредством атомов дигидропиримидинового кольца и атомов заместителя при четвертом атоме углерода дигидропиримидинового цикла, что также подтверждает ранее сделанные предположения.

При встраивании гетероциклических подандов в рецептор дигидропиримидиновые циклы находятся около GLN28, PHE31, ARG32, LYS53, VAL54, ARG60, а подандная цепь располагается вне полости рецептора, что говорит о том, что она является стерическим препятствием в процессе встраивания в полость рецептора.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено теоретическое исследование характерных частей молекул мембранотропных туберкулостатических соединений класса ингибиторов дигидрофолатредуктазы. В рамках 3D-

QSAR алгоритма CiS рассмотрены особенности строения комплексов модельный рецептор—лиганд. Найдены конформеры, обеспечивающие биологическое действие соединения, а также определены фармакофорные и антифармакофорные части молекул. Выявлено, что фармакофорными фрагментами являются дигидропимидиновый фрагмент, оксиацильный радикал и часть ароматического заместителя, соединенная с гетероциклическим фрагментом, которые обеспечивают связывание с липофильной, положительно и отрицательно заряженными областями рецептора. Найдена количественная зависимость величины туберкулостатической активности от электронных характеристик взаимодействия рецептор—лиганд (коэффициент корреляции 0,90). Проведенные квантово-химический анализ и моделирование лекарственных средств с ферментом подтверждают результаты, полученные с помощью алгоритма CiS для модельного рецептора. Так, связывание лекарственного средства осуществляется за счет взаимодействия атомов дигидропиримидинового кольца с DHFR. Подандная цепь, по данным анализа, выполняет транспортную мембранотропную функцию и способствует транспорту катионов металлов через многослойную мембрану *M. tuberculosis*, однако на стадии образования комплекса с DHFR она может создавать стерические препятствия, поэтому после проникновения через мембрану молекула, содержащая подандную цепь, подвергается метаболизму, образуя небольшие фрагменты, проявляющие высокую биологическую активность.

Полученные результаты могут быть использованы для целенаправленного синтеза эффективных противотуберкулезных препаратов, а также прогноза туберкулостатической активности новых соединений.

Работа выполнена при поддержке программы "СКИФ-ГРИД" союзного государства России и Белоруссии, гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 07-03-96041-а.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hansch C., Fujita T.* // J. Amer. Chem. Soc. – 1964. – **86**. – P. 616.
2. *Doweyko A.M.* // J. Med. Chem. – 1988. – **31**, N 4. – P. 1396.
3. *Schneider G., Baringhaus K.-H., Kubinyi H.* Molecular Design: Concepts and Applications. – N. Y.: Wiley, 2008.
4. *Cruciani G., Mannhold R., Kubinyi H., Folkers G.* Molecular Interaction Fields: Applications in Drug Discovery and ADME Prediction. – N. Y.: Wiley, 2005.
5. *Kubinyi H.* // Drug Discov. Today. – 1997. – **2**, N 5. – P. 538.
6. *Ooms F.* // Curr. Med. Chem. – 2000. – **7**, N 1. – P. 141.
7. *Karelson M.* // Thesis doc. Molecular Descriptors in QSAR/QSPR. – N. Y., 2000. – **5**. – P. 430.
8. *Потемкин В.А., Гришина М.А., Белик А.В., Чупахин О.Н.* // Хим.-фарм. журн. – 2002. – **36**, № 1. – С. 22.
9. *Потемкин В.А., Гришина М.А., Барташевич Е.В.* // Журн. структур. химии. – 2007. – **48**, № 1. – С. 153.
10. *Blanchard J.S.* // Ann. Rev. Biochem. – 1996. – **65**, N 6. – P. 215.
11. *Kappe C.O.* // Eur. J. Med. Chem. – 2000. – **35**. – P. 1043 – 1052.
12. *Li R., Sirawaraporn R., Chitnumsub P. et al.* // J. Mol. Biol. – 2000. – **295**, N 7. – P. 307.
13. *Potemkin V., Grishina M.* // Drug Discovery Today. – 2008. – **13**. – P. 952.
14. *Потемкин В.А., Барташевич Е.В., Переяславская Е.С., Гришина М.А.* // Тез. докл. XIII Симп. межмолек. взаимод. конформ. молек. – СПб, 2006. – С. 179.
15. *Allinger N.L., Yuh Y.H., Lii J.H.* // J. Amer. Chem. Soc. – 1989. – **111**, N 23. – P. 8551.
16. *Lii J.H., Allinger N.L.* // Ibid. – P. 8566.
17. *Lii J.H., Allinger N.L.* // Ibid. – P. 8576.
18. *Потемкин В.А., Гришина М.А., Федорова О.В. et al.* // Хим.-фарм. журн. – 2003. – **9**, № 3. – С. 17.
19. *Барташевич Е.В., Гришина М.А., Потемкин В.А., Белик А.В.* // Журн. структур. химии. – 2002. – **43**. – С. 1120.
20. *Schmidt M.W., Baldrige K.K., Boatz J.A., Elbert S.T., Gordon M.S., Jensen J.H., Koseki S., Matsunaga N., Nguyen K.A., Su S.J., Windus T.L., Dupuis M., Montgomery J.A.* // J. Comput. Chem. – 1993. – **14**, N 14. – P. 1347.
21. *Бейдер Р.* Атомы в молекулах. – М.: Мир, 2001.
22. *Овчинникова И.Г., Федорова О.В., Русинов Г.Л. и др.* // Хим.-фарм. журн. – 2003. – **37**, № 11. – С. 17.
23. *Li R., Sirawaraporn R., Chitnumsub P. et al.* // J. Mol. Biol. – 2000. – **295**. – P. 307.
24. *Гришина М.А., Потемкин В.А., Микушина К.М. и др.* // Биомед. химия. – 2004. – **50**, № 1. – С. 68.
25. *Grishina M.A., Potemkin V.A., Rusinov G.L. et al.* Book of Abstr. 3rd Crystallographic course at the E. Majorana Centre "From Genes to Drugs via Crystallography". – Erice, 2002. – P. 48.
26. *Mikuchina K., Potemkin V., Grishina M., Laufer S.* // Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. – 2002. – **335**. – P. 74.